



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0405483-0 B1



(22) Data do Depósito: 02/12/2004

(45) Data de Concessão: 23/07/2019

---

(54) **Título:** PROCESSO DE OBTENÇÃO DO EXTRATO PADRONIZADO DE PRÓPOLIS, EXTRATO ASSIM OBTIDO, SUAS FORMULAÇÕES, PRODUTOS E USOS

(51) **Int.Cl.:** A61K 35/644; A61K 8/98; A23L 21/20; A61P 29/00; A61P 33/00; (...).

(73) **Titular(es):** APIS FLORA INDL. COML. LTDA.

(72) **Inventor(es):** ANDRESA APARECIDA BERRETTA; ANTÔNIO CARLOS MEDA; MANOEL EDUARDO TAVARES FERREIRA.

(57) **Resumo:** "PROCESSO DE OBTENÇÃO DE EXTRATO PADRONIZADO DE PRÓPOLIS, EXTRATO ASSIM OBTIDO, SUAS FORMULAÇÕES, PRODUTOS E USOS". Refere-se a presente invenção a um processo de obtenção de extrato padronizado de própolis, ao extrato padronizado propriamente dito, suas formulações, produtos e suas utilizações terapêuticas, sendo que o processo utiliza como matéria-prima, a própolis 'in natura' proveniente de regiões específicas de acordo com a bioatividade e análise química de cada uma, em critério de proporcionalidade em função do teor dos marcadores encontrados na matéria-prima, que assegura uma composição química e atividade biológica dentro dos limites de aceitabilidade especificados e estável em todos os lotes pesquisados, garantindo a eficácia terapêutica das mesmas. O extrato padronizado é usado no combate às doenças que se caracterizam por infecções microbianas, virais, fúngicas, parasitárias, tumorais, queimaduras e feridas, etc., em função das atividades biológicas: atividade antimicrobiana frente a microrganismos gram negativos, gram positivos, antifúngica, antioxidante, antimutagênica, antiinflamatória, antiparasitária, cicatrizante e regeneradora de tecidos, podendo ser empregado como matéria-prima para a indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia.

**Processo de obtenção do extrato padronizado de própolis, extrato assim obtido, suas formulações, produtos e usos.**

Refere-se a presente invenção a um processo de obtenção de extrato padronizado de própolis, ao extrato estável e reprodutível, obtido por este processo, suas formulações, produtos e aos usos deste extrato padronizado no combate às doenças que se caracterizam por infecções microbianas, virais, fúngicas, parasitárias, tumorais, queimaduras e feridas, etc., em função das atividades biológicas: atividade antimicrobiana frente a microrganismos *gram* negativos, *gram* positivos, antifúngica, antioxidante, antimutagênica, antiinflamatória, antiparasitária, cicatrizante e regeneradora de tecidos, podendo ser empregado como matéria-prima para a indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia.

Os produtos de origem natural têm sido amplamente pesquisados nos últimos anos, não somente as plantas medicinais propriamente ditas, mas também os produtos apícolas, como é o caso da própolis.

A própolis, um produto elaborado pelas abelhas *Apis mellifera* a partir dos exsudatos vegetais, apresenta uma série de propriedades terapêuticas. Alguns estudos realizados, demonstraram a atividade anti-séptica, cicatrizante, anestésica, antiviral, antitumoral, antiinflamatória da própolis e regeneradora em lesões provocadas por queimaduras (MURESAN, 1978; TSAKOFF, 1978).

A própolis tem sido usada desde tempos remotos na medicina tradicional em diversas partes do mundo. Muitos países estão interessados na utilização de produtos naturais para a cura das doenças e a própolis tem sido proposta com diversas finalidades terapêuticas. Tem sido muito pesquisada nos países europeus e também em outros do Continente Americano, como Cuba e Brasil.

Externamente, a própolis tem sido usada para obtenção de produtos farmacêuticos e cosméticos como as loções anti-acne, cremes faciais, pomadas para ferimentos e queimaduras, loções e soluções para as mais diversas aplicações, considerando principalmente a sua atividade antimicrobiana, antiinflamatória e cicatrizante (GHISALBERTI, 1979).

A própolis (pró: em prol de, em defesa + polis: cidade), é uma substância resinosa natural coletada de partes das plantas, brotos e exsudatos vegetais, e transformada pelas abelhas, sendo utilizada para a proteção da colméia. Assim, percebeu-se que os insetos e microrganismos eram imobilizados pela própolis mantendo-se o meio ambiente da colméia asséptico (BANKOVA, 2000). A "cola das abelhas", como também é conhecida a própolis, possui odor aromático característico e coloração variada, em função da fonte e idade. Os componentes identificados na resina de própolis originam-se de três fontes: exsudatos coletados de plantas, ceras originárias

06

do metabolismo das abelhas e materiais que são introduzidos durante a elaboração da própolis, como o pólen, tricomas, brotos, etc.

A própolis é uma goma resinosa e de coloração escura que as abelhas coletam das plantas, misturam com secreções glandulares e utilizam na fixação, vedação e preservação de suas colméias (BANKOVA, 2000). O exsudato é coletado de diferentes plantas, dependendo da localização geográfica. Em zonas temperadas, o exsudato é coletado pelas abelhas preferencialmente de "álamo" e a própolis contém principalmente compostos fenólicos típicos do botão de "álamo" (MARCUCCI, 1997). A composição química da própolis originária da Europa, da Ásia e da América do Norte é rica em flavonóides e ésteres substituídos do ácido cinâmico (BANKOVA, 1996). Estes polifenóis (flavonóides e ésteres do ácido cinâmico) são conhecidos por apresentarem atividade antibacteriana. Os principais constituintes da própolis (flavonóides), estão ausentes ou em baixas concentrações na própolis Brasileira, mas quantidades substanciais dos derivados prenilados das benzofenonas e ácido cinâmico foram encontrados (BANKOVA, 1995). Nas amostras européias, o conteúdo em flavonóides esteve na faixa de 20-30%, enquanto que na própolis brasileira encontrou-se de 3-7% (MARCUCCI, 1999). Pode-se concluir que a própolis brasileira é caracterizada por baixa concentração de flavonóides e ésteres do ácido fenólico e altas concentrações do ácido diidrocinâmico, acetofenonas preniladas e de alguns terpenóides específicos (BANKOVA, 1995). Apesar da diferença, as amostras da própolis brasileira mostraram atividade antibacteriana similar ou melhor à própolis da Europa (BANKOVA, MARCUCCI, 1996).

A composição da própolis é quali e quantitativamente variável, dependendo da ecologia da região da planta (KOO, 1999). O efeito sazonal também pode contribuir para sua composição química, porém SFORCIN, et al, 2000, demonstraram que não há diferença significativa com relação ao efeito sazonal na curva de sobrevivência de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, após incubação com própolis. A atividade antimicrobiana mostrou-se eficiente, principalmente frente a bactérias gram positivas. O efeito sazonal também não afetou a atividade imunomoduladora da própolis Brasileira, conforme demonstrado por SFORCIN, et al (2002) e tampouco os parâmetros bioquímicos séricos pesquisados, demonstrando assim que, apesar da complexa composição química da própolis, os parâmetros como concentração de proteína total, glicose, uréia, creatinina, colesterol e a determinação de aminotransferases (AST e ALT) e a deidrogenase láctica (LDH), não foram afetados, indicando assim que não foram observadas alterações clínicas nos animais estudados quando da administração de própolis via oral obtida em diferentes estações do ano (SFORCIN, et al, 2002).

07

Em virtude das diferenças químicas encontradas nas própolis de diferentes regiões do país, é de suma importância conhecer as características de cada própolis para compor um extrato padronizado.

5 A composição precisa da própolis bruta varia de acordo com a fonte vegetal. Em geral, a mesma é composta por 50% de resinas e bálsamos vegetais, 30% de cera, 10% de óleos aromáticos e essenciais, 5% de pólen e 5% de várias outras substâncias (JENG, S. N., et al. 2000). 08

10 Os compostos isolados da própolis possuem uma série de atividades terapêuticas, porém, no extrato de própolis, seus efeitos se potencializam. Os grupos químicos mais importantes que apresentam grande influência na atividade terapêutica são:

Compostos fenólicos como:

- 15 - Ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (PHCA), ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (DHCA ou ARTEPELIN C) e também derivados prenilados do ácido cinâmico compostos por benzofenonas, parecem ser grandes responsáveis pelas atividades terapêuticas da própolis, como antimicrobiana, antitumoral, antiinflamatória, antiedematogênica e também cicatrizante (MARCUCCI, et al, 1999);
- Flavonóides, tais como quercetina, galangina, pinocembrina, crisina dentre outros;
- 20 - Ácido benzóico e seus derivados;
- Ácido caféico e p-cumárico e seus derivados;
- Derivados do ácido e álcool cinâmico;
- Ácido salicílico;
- Derivados do benzaldeído;
- Terpenos;
- 25 - Compostos voláteis, dentre muitos outros.

A própolis apresenta uma série de substâncias capazes de agir terapêuticamente no organismo. Dentre suas principais atividades, encontramos a atividade antimicrobiana, atividade antiinflamatória, atividade cicatrizante, atividade anestésica, antiviral, frente a herpes simplex tipo I e II (VYNOGRAD, et al. 2000) e 30 atividade imunomoduladora (SFORCIN, et al. 2002, O HOHEISEL, 2001).

Muitos estudos têm sido realizados a fim de se obter maiores informações sobre a composição química e atividades biológicas da própolis das diferentes regiões do Brasil.

35 MARTINS, et al. (2002) avaliaram o efeito do extrato etanólico de própolis comercial no crescimento in vitro de Candida albicans coletada de pacientes brasileiros HIV soro-positivos e soro-negativos em candidíase oral. Demonstrou-se que o extrato de própolis inibiu o crescimento in vitro da Candida albicans

coletadas dos pacientes HIV soropositivos, formando uma zona de inibição como a formada pelo medicamento referência, nistatina (anti-fúngico).

JENG, et al. (2000) demonstraram que o extrato etanólico de própolis é um inibidor para a mutagenicidade de dois mutágenos diretos, 4-nitro-O-fenilenediamina e 1-nitropireno e para dois mutágenos indiretos, 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]quinolina e benzo[a]pireno. 09

As seguintes substâncias foram isoladas do extrato de própolis e suas atividades farmacológicas foram testadas: PHCA, ARTEPELIN C, DCBEN e DPB. Observou-se que o DPB apresentou atividade frente a *T. cruzi* (ED50 / 24 horas – mg/mL – de  $0,743 \pm 0,052$ ), atividade antimicrobiana frente a bactérias gram negativas como a *E. coli* e a *Pseudomonas aeruginosa* e bactérias gram positivas como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis* e também um efeito relaxante em traquéia isolada de porcos (MARCUCCI, 2001).

O ARTEPELIN C é o principal componente da própolis brasileira, o qual foi isolado por AGA et al. (1994) a partir do extrato alcoólico de própolis. Apresenta a fórmula química  $C_{19}H_{24}O_3$ , peso molecular 300.40 e nome químico ácido 3-[4-hidroxi-3,5-bis-(3-metil-2-butenilfenil)-2-propenóico, sendo pouco solúvel em água. Exibe atividade antibacteriana, antiviral e citocida, frente a tumores sólidos e em células leucêmicas (KIMOTO, 2001), sendo que os efeitos mais marcantes foram observados em linhagens de células T, através de indução apoptótica e fragmentação de DNA (KIMOTO, T. et al. 2000). Observou-se ainda que o DHCA não afetou os linfócitos normais (KIMOTO, 2001). Sabe-se que a atividade antibacteriana desta classe de estruturas pode ser melhorada pelo aumento do número de resíduos prenil na mesma. O ácido 3,5-prenil-4-hidroxicinâmico foi avaliado também por Banskota et al. (1998) mostrando uma importante atividade contra o tumor humano fibrossarcoma (BANKOVA, 2000).

MARCUCCI, et al. (1996) analisaram as amostras de própolis de diferentes origens (São Paulo, Paraná, Ceará e Barbosa-SP) das quais foram quantificados os aminoácidos que podem ser responsáveis, em parte, pelos processos regenerativos como a cicatrização e o crescimento celular nos tecidos dos mamíferos (MARCUCCI, et al. 1996).

Assim, MARCUCCI, et al. (1995), propõe a seguinte composição em aminoácidos para diferentes regiões como demonstrado na tabela 1.

**Tabela 1:** Aminoácidos encontrados nas amostras de própolis (mg/g).

Regiões	SP (Brunelli)	PR	Ceará	SP (Barbosa)
Aminoácidos Totais	87,04	18,89	13,56	62,37

Com relação às diferenças na composição em flavonóides e na atividade antimicrobiana frente a *Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii* e *Staphylococcus aureus*, obtidas através de análise por cromatografia líquida de alta

eficiência e halo de inibição em placa respectivamente, das amostras de própolis, obtidas em regiões distintas do Brasil, KOO et al. (1999) e PARK, et al. (1998), demonstram os resultados, em média por região, listados na tabela 02.

5 A quercetina, um flavonol presente na própolis, apresenta um amplo espectro de ação farmacológica. ZHAO, et al. (1999) demonstraram que a quercetina modula a liberação de endotelina, PGI2 de células endoteliais vasculares e o ativador de plasminogênio tecidual. Assim, a quercetina causa vasodilatação por mecanismos dependentes e independentes de endotélio, atua ainda diminuindo a concentração sérica da fração LDL do colesterol em função de sua atuação como agente sequestrante de radicais livres e inibidor da peroxidação lipídica.

10 **Tabela 2** – Flavonóides (mg/g) e atividade antimicrobiana (halo de inibição – mm) encontrados nas amostras de própolis de diferentes regiões, em média (KOO, et al (1999) e PARK, et al. (1998).

Regiões Flavonóides	RS	PR	SP	MG
Quercetina	3,40	1,303	2,20	1,05
Kaempferol	3,85	1,10	3,32	1,80
Apigenina	1,81	1,50	2,78	0,50
Isoramnetina	N	2,30	N	1,10
Ramnetina	0,80	0,50	1,35	N
Pinocembrina	12,05	12,60	0,40	1,55
Sakuranetina	14,60	7,50	9,24	14,40
Isosakuranetina	N	N	N	0,20
Crisina	11,6	9,70	9,55	2,10
Acacetina	14,7	4,90	13,00	6,30
Galangina	7,88	7,00	7,02	0,50
Kaempferide	2,15	3,20	N	11,30
Tectocrisina	3,30	1,00	N	N
Total	76,14	52,60	48,86	40,80

#### Atividade Antimicrobiana

S. mutans	2,25	1,0	1,5	1,0
A. naeslundii	2,75	1,5	2,0	2,25
S. aureus	1,50	1,0	1,0	0,75

15 N: não detectado

A própolis tem sido utilizada para o tratamento de muitas enfermidades da pele: nas intervenções queratósicas ou seborréicas, na fragilidade cutânea, nas contusões, no tratamento de feridas, de queimaduras, herpes simples e genital, de abscessos, de furúnculos, de supurações diversas, de úlcera por decúbito, de

verrugas, de ferimentos, de certas micoses e de manifestações cutâneas diversas da herpes, entre outras, em função principalmente de suas propriedades biológicas: anti-séptica, cicatrizante, regeneradora de tecidos, protetora, antiinflamatória, anti-viral, anti-tumoral, dentre outras (BOLSKAKOVA, 1975; SOBOLEVA et al, 1990; GIURCANEANU et al, 1988; MILLET - CLERC et al, 1987; FIERRO MORALES, 1994).

GIRAL, et al. (1985) citam os resultados de pesquisa realizada durante três anos com emprego de própolis no tratamento de afecções dermatológicas, utilizando a tintura de própolis de 3 a 5% de resíduo seco, em preparações de pomada a 10% em duas bases diferentes: hidrofóbica e hidrofílica.

GREGORY, et al. (2002) realizaram uma comparação entre um creme de própolis e outro de sulfadiazina de prata em tratamento de pacientes apresentando queimaduras brandas. Seus resultados demonstraram que não houve diferença significativa quanto à contaminação microbiana, porém, as lesões tratadas com creme de própolis mostraram menor inflamação e cicatrização mais rápida do que o antibiótico convencional.

ATIASOV (1978) relatou em seus trabalhos que aplicando-se própolis na forma de pomada em 830 pacientes de 17 meses a 87 anos de idade com queimaduras profundas, estendendo-se até 75% da superfície do corpo. Os resultados obtidos foram similares aos de KAZAKOV et al em 1957; GLAGOLEVA, 1960; KIVALINA, 1960 e KIRSANOV, 1965. Estes concluíram que a própolis tem ação bactericida contra os microrganismos gram negativo e gram positivo, influência estimulativa no processo de regeneração das feridas (MAGRO FILHO E CARVALHO, 1990), intensificando a proliferação epitelial e o crescimento da granulação, melhorando a circulação sanguínea e linfática, e diminuindo a permeabilidade de vasos da superfície da ferida. Em outra pesquisa o autor notou uma visível tendência de diminuição dos neutrófilos, o que demonstra ativação do processo de regeneração das feridas. Notou também que a troca do curativo é menos dolorida, não causando traumas nas granulações, o que é de suma importância na fase pós-enxerto da pele.

Ao se utilizar a própolis em curas para feridas foi observada a ação cicatrizante. Nos 5º e 7º dias pode-se observar a aparição do tecido de granulação com maior quantidade de fibroblastos maduros. Os fibroblastos, células estimuladas pelas citocinas e macrófagos, produzem colágeno e proteoglicanas que participam ativamente do desenvolvimento do tecido de granulação (tecido novo).

DIAZ, et al. (1997), estudaram o mecanismo pelo qual a própolis acelera a cicatrização e observaram diminuição do exsudato inflamatório agudo com o aumento da quantidade de fibroblastos maduros, inibição da degranulação das células, que explicaria a diminuição do edema e da inflamação observada clinicamente com o emprego tópico destes medicamentos, aumento do índice mitótico do extrato

basal da epiderme, aumento da queratinização, que explica o porquê das feridas serem reparadas em menor tempo.

No tratamento local de queimados, constatou-se a propriedade revitalizante da própolis, mediante a diminuição da infiltração linfocitária e do aumento do tecido de granulação que tem aplicação local em queimaduras de segundo e terceiro graus. Esta propriedade, como concordam vários grupos médicos, facilita o trabalho com os pacientes ambulatoriais, permitindo considerar esta terapêutica como um valioso recurso.

A propriedade antiinflamatória foi verificada em 75 pacientes que foram expostos a uma insolação. Observou-se que as zonas protegidas com própolis apresentaram menor edema e que o eritema retrocedeu mais rapidamente do que os grupos controles. Esta propriedade intrínseca da própolis lhe confere grande utilidade para o tratamento de lesões dolorosas como aftas e queimaduras. Nestes casos, os pacientes relataram "ardor" nos primeiros segundos, seguido do efeito anestésico local, que trazia alívio para as dores.

A atividade antimicrobiana foi uma das primeiras atividades a serem pesquisadas, e se deu em função das observações nas colméias. Várias cepas de microrganismos foram testadas. MERESTA E MERESTA (1985) estudaram a sensibilidade de 75 cepas bacterianas frente à ação da própolis. Todas as cepas exibiram alta sensibilidade ao extrato de própolis, sendo que a sensibilidade foi marcante frente as cepas de *Staphylococcus* spp e *Streptococcus* spp. A atividade antimicrobiana da própolis contra *S. aureus* 209P teve uma concentração inibitória mínima (CIM) e uma concentração bacteriana mínima de 10 e 120 µg/ml respectivamente. VALDEZ GONZALEZ et al. (1985) observaram que o extrato etanólico de própolis inibiu o crescimento de várias bactérias incluindo as cepas de *Streptococcus* e *Bacillus*. GRANGE E DAVEY (1990) relataram que as preparações de extrato etanólico de própolis (3 mg/mL) inibiram completamente o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* e *E. coli*, mas não tiveram efeito sobre a *Klebsiella pneumoniae*.

Como demonstrado quimicamente através das tabelas 1 e 2, a própolis apresenta diferenças regionais, sendo assim, as características organolépticas e biológicas também variam em função da origem vegetal da região de onde a mesma foi obtida. Assim, esta variação de produto é uma das maiores dificuldades encontradas para que os extratos disponíveis no mercado apresentem condições técnicas para se tornarem medicamentos.

Desta forma, a presente invenção pretende disponibilizar um extrato padronizado de própolis, estável e reproduzível, para que atenda as características desejadas pela indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia.

12

Mais especificamente, a presente invenção se refere a processo de obtenção de extrato padronizado de própolis, ao extrato padronizado propriamente dito e suas utilizações terapêuticas, sendo que o processo utiliza como matéria-prima, a própolis "in natura" proveniente de regiões específicas de acordo com a bioatividade e análise química de cada uma, em critério de proporcionalidade em função do teor dos marcadores encontrados na matéria-prima, que assegura uma composição química e atividade biológica dentro dos limites de aceitabilidade especificados e estável em todos os lotes pesquisados, garantindo a eficácia terapêutica das mesmas.

Para facilitar o entendimento da presente invenção são anexadas as seguintes figuras:

- Fig 1 : Estrutura química do ARTEPELIN C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico);
- Fig. 2: Estruturas químicas quantificadas no extrato padronizado de própolis, um dos objetos da presente invenção;
- Fig. 3: Cromatograma obtido em CLAE do extrato padronizado de própolis.

O processo de obtenção de extrato padronizado de própolis, um dos objetos da presente invenção, compreende as etapas de:

(a) coleta da própolis "in natura" proveniente de apicultores, separação desta matéria-prima em lotes padronizados em função dos marcadores químicos identificados e quantificados no controle de qualidade, seguindo metodologia analítica específica descrita adiante;

(b) homogeneização das matérias-primas avaliadas em (a), em misturador de sólidos, em proporções variáveis de acordo com os teores encontrados dos marcadores na própolis "in natura", de modo a obter o extrato padronizado de própolis dentro dos limites de qualidade especificados para a presente invenção, conforme descrição adiante;

(c) congelamento da mistura homogênea "in natura" obtida em (b), a uma temperatura de  $-25^{\circ}\text{C}$  a  $-5^{\circ}\text{C}$ , seguida de pulverização em moinho de martelo;

(d) adição da mistura obtida em (c) ao tanque de aço inox com agitador contendo solução hidroalcoólica na faixa de 50 a 95% v/v, na proporção de 1:2 a 1:5, seguida de agitação contínua por 8 - 12 horas e, subsequente repouso por 24 horas, durante três a 10 dias;

(e) filtração do extrato assim obtido e transferência deste para um tanque homogeneizador;

(f) resfriamento do extrato homogeneizado a  $-10^{\circ}\text{C}$  a  $+10^{\circ}\text{C}$  para eliminação da cera;

(g) submissão do extrato às análises físico-químicas e microbiológicas de qualidade para o extrato assim obtido;

(h) produção de extrato mole através da concentração do extrato padronizado obtido, em concentrador de aço inox, à temperatura controlada do produto em torno de  $40,0^{\circ}\text{C}$  a

70°C e vácuo de 400,0 a 700 mmHg, até que o extrato apresente teor de resíduo seco de 80% p/p;

(i) análise do extrato padronizado contendo ácido *p*-cumárico, artepelin C (Ácido 3,5-diprenil-*p*-cumárico), bacharina (Ácido 3-prenil-4-diidrocinamoiloxi-cinâmico) e posterior armazenagem.

Desse modo, o extrato padronizado de própolis obtido pelo processo acima, especialmente empregando a temperatura de -10°C a -5°C na etapa (c), utilizando como veículo de extração a solução hidroalcolica de 60 a 80% v/v, na proporção de 1:2 a 1:3, seguida de agitação contínua por 12 horas e subsequente repouso por 24 horas durante 3 dias conforme processo descrito na etapa (d), e ainda, a temperatura de 50° a 60°C e a pressão de vácuo a aproximadamente 500,0 mmHg, na etapa (h), é constituído das seguintes características: 80,0% (72,0 – 88,0% m/m) de resíduo seco; 48,00 mg/g (44,00 – 52,00 mg/g) de flavonóides totais expressos em quercetina; 7,00 mg/g (6,00 – 8,00 mg/g) de ácido *p*-cumárico; 90,00 mg/g (80,00 – 100,0 mg/g) de artepelin C e 35,00 mg/g (30,00 – 40,00 mg/g) de baccharina; ainda, apresenta um aspecto viscoso e homogêneo de coloração âmbar escuro, com odor e sabor característicos. Deverá apresentar atividade antimicrobiana quando diluído a 10,0 mg/mL de resíduo seco, “in vitro” frente aos microrganismos *Micrococcus luteus* e *Staphylococcus aureus*, conforme método de difusão em ágar, e ainda apresentar contagem microbiana e fúngica dentro dos limites especificados, sendo eles: máximo de 10<sup>4</sup> UFC/g (unidades formadoras de colônias) para bactérias totais e máximo de 5 x 10<sup>3</sup> UFC/g para fungos totais, sendo que deverá estar isento de patógenos, conforme metodologia farmacopéica vigente.

Para as propostas da presente invenção, o extrato padronizado de própolis poderá ser diluído em veículos e/ou excipientes aceitos pela legislação em vigor para produtos farmacêuticos, cosméticos e alimentícios a fim de atender às necessidades do produto final desejado, podendo ser utilizado para uso externo ou interno, conforme o caso.

Em outra concretização particular da invenção, o extrato padronizado de própolis poderá ser empregado em diferentes concentrações das substâncias ativas, uma vez que este poderá ser diluído, conforme desejado, originando extratos dentro da faixa de 1 a 88% de resíduo seco, com as respectivas alterações de concentração dos demais marcadores empregados.

Vantajosamente a presente invenção poderá ser empregada na indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia, de modo superior aos demais produtos existente no mercado, uma vez que a presente invenção foi avaliada quanto aos caracteres físico-químicos, microbiológicos e biológicos. Assim todos os exemplos

apresentados foram estudados com o objeto da presente invenção, justificando-se assim todas as reivindicações.

### EXEMPLOS

#### EXEMPLO 1

5 Estudou-se a própolis "in natura" obtida do Brasil, proveniente de diferentes regiões. Além destas matérias-primas, estudaram-se também os extratos padronizados de própolis, objetos da presente invenção e também conhecidos pela sigla EPP-AF (Extrato Padronizado de Própolis – Apis Flora) sendo que os lotes padronizados foram compostos pelas matérias-primas avaliadas, de acordo com os critérios pré-estabelecidos de proporcionalidade e sistematicamente reproduzíveis quanto aos parâmetros de qualidade anteriormente descritos.

A análise de Determinação de Flavonóides Totais por Espectrofotômetro é realizada de acordo com o método preconizado pela Instrução normativa nº 3, de 19/01/2001 (anexo VII) e Woisky, 1996.

15 A Identificação e a Quantificação dos marcadores químicos foi feita por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), conforme a seguinte metodologia:

a) preparação das amostras: 100 µL do extrato padronizado de própolis - EPP-APF da presente invenção são diluídos para 1 mL em metanol.

20 b) tratamento prévio das amostras: centrifugação a 13000 rpm, durante 5 minutos e filtração em filtro de 45 mm.

c) fase móvel: gradiente multilinear desenvolvido, apresentado na tabela a seguir:

**Tabela 3** – Gradiente multilinear de eluição para análise qualitativa em CLAE de extratos de própolis.

Tempo (min)	Bomba A (%)	Bomba B (%)
0 – 5.0	75	25
10.0	65	35
15.0	62	38
20.0	60	40
45.0	55	45
50.0	30	70
55.0	20	80
60.0	0	100

25 Onde Bomba A: 93,9% água + 0,8% de ácido acético + 0,3% de acetato de amônio + 5% metanol; Bomba B: acetonitrila

Fluxo: 1 mL/min; Detecção: UV 280 e 320 nm

São identificados e quantificados os princípios ativos das amostras, listadas na figura 2.

Os tempos de retenção em minutos dos marcadores estudados nas matérias-primas e produtos acabados são: ácido cinâmico (5,9 min.); aromadendrina 4'-metil-éter (20,7 min.); drupanin (26,2 min.); isosakuranetina (35,6 min.), artepelin C (55,2 min) e baccharina (58,3 min).

Para a avaliação da atividade antimicrobiana é utilizado o método de difusão em ágar (KUJUMGIEV, 1999). Os microrganismos utilizados como teste são *Micrococcus luteus* – cepa ATCC 9341 e *Staphylococcus aureus* - cepa ATCC 25923. A atividade antimicrobiana é medida através da formação do halo de inibição sobre uma camada de ágar, após incubação por 72 horas a temperatura de 37°C.

Para comprovar que o extrato padronizado de própolis-EPP-AF da presente invenção resiste a condições drásticas de temperatura e umidade, iniciamos um estudo de estabilidade acelerado 40°C ± 2°C e UR de 75% ± 5%. O teste de estabilidade proposto, submete o EPP-AF a condições de tensão que desafiam sua estabilidade, sendo uma ferramenta útil para prever a viabilidade do produto (Rieger, 1996). A estabilidade dos extratos será avaliada de acordo com o programa de estabilidade proposto pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) na Resolução 391, de 9 de agosto de 1999, onde se propõe que as formulações sejam submetidas à estufa (40°C ± 2 – Umidade Relativa 75% ± 5) pelo período de seis meses sendo realizadas as análises em 0, 30, 60, 90 e 180 dias. Estas formulações, após a aplicação das condições de tensão, serão analisadas para detecção de alterações nas suas características físico-químicas, mediante os ensaios de quantificação de seus marcadores.

Como já mencionado previamente um dos objetos da presente invenção, o Extrato Padronizado de Própolis – EPP-AF, foi proposto com uma padronização inédita e surpreendente, para que este seja reconhecido como um medicamento/insumo farmacêutico e que possa ser utilizado em diferentes formas farmacêuticas com a garantia de que as suas características físico-químicas e biológicas irão proporcionar eficácia e segurança ao paciente.

Para a justificação da composição do extrato padronizado de própolis - EPP-AF, apresentamos como exemplo os resultados encontrados na avaliação das matérias-primas "in natura" de diferentes regiões, que foram empregadas, conforme tabela 4 (análise dos marcadores e atividade antimicrobiana), onde se pode confirmar as diferenças quali e quantitativas dos constituintes químicos que impedem o uso industrial da própolis como um medicamento, corroborando os dados apresentados na revisão da literatura.

16

**Tabela 4** – Resultados das análises do teor dos marcadores (HPLC) e atividade antimicrobiana (halo de inibição) realizadas no extrato de própolis obtido em aparelho soxhlet e padronizado a 11% p/v e 10mg/mL, respectivamente, nas amostras de própolis “in natura” originárias de diferentes regiões (resultados expressos em mg/mL).

Amostras	Região 1	Região 2	Região 3	Região 4	Região 5
Ensaio					
Flav. Totais (*)	1,410	1,430	1,120	2,160	2,750
Ác. P-cum.	0,120	0,160	0,547	2,600	1,830
Ác. Cinâmico	0,365	0,304	0,289	-	-
Aromadendrin	0,450	0,121	0,309	1,090	-
Drupanin	-	-	-	1,800	-
Isosakuranetin	-	0,450	-	-	-
Artepelin C	1,710	4,600	-	18,430	21,120
baccharina	1,010	2,580	-	16,180	10,250

17

5 **Avaliação Atividade Antimicrobiana**

<i>Microc. luteus</i>	Sensível	Sensível	Sensível	sensível	Sensível
<i>Staph. aureus</i>	Sensível	Sensível	Sensível	sensível	Sensível

(\*) % m/m

Com o objetivo da padronização dos lotes, avaliou-se os lotes padronizados de EPP-AF (matéria-prima ‘in natura’ – conforme descrito no item (c) do procedimento de obtenção do extrato), com relação às características físico-químicas e atividade antimicrobiana, permitindo a verificação de que as amostras utilizadas apresentavam atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus*, bem como os parâmetros físico-químicos. Como pode ser observado na tabela 5 houve homogeneidade dos lotes que darão origem aos extratos padronizados.

15 **Tabela 05** – Resultados das análises físico-químicas e atividade antimicrobiana (halo de inibição) realizadas nos extratos de própolis obtidos em soxhlet estando a 11,0% p/v e 10,0 mg/mL de resíduo seco, respectivamente, obtidos das amostras de lotes padronizados de própolis “in natura” – conforme item (c) do processo de obtenção (mg/mL).

Ensaio	Lotes padronizados da matéria-prima “in natura” (etapa (c) do processo)				
Lotes	005/01	006/01	001/03	002/03	001/04
Flav. Tot (*)	2,620	2,520	2,330	2,370	2,340
Ac. P-cumár.	0,160	0,220	0,131	0,132	0,182
Artepelin C	1,750	2,116	1,490	1,710	1,620
Baccharina	0,984	1,245	0,984	0,910	0,800

**Avaliação Atividade Antimicrobiana**

Micr. Luteus	Sensível	Sensível	Sensível	Sensível	Sensível
St. Aureus	Sensível	Sensível	Sensível	Sensível	Sensível

(\*)% m/m

Apresentamos ainda os resultados médios dos marcadores químicos encontrados no extrato padronizado de própolis - EPP-AF em algumas concentrações, como exemplo 11% p/v, 30,0% p/v e 80% m/m.

- 5 **Tabela 6** – Resultados das análises do teor dos marcadores (HPLC) e atividade antimicrobiana (contagem em placa) realizada nas amostras de extrato padronizado de própolis - EPP-AF nas concentrações de resíduo seco de 11,0% p/v, 30% p/v e 80% m/m, como exemplo ilustrativo da presente proposta desta invenção (mg/mL).

Amostras	11,0%	30,0%	80,0%
Ác. P-cum.	0,974	2,700	7,250
Artepelin C	11,800	32,150	86,100
Baccharina	4,990	13,620	37,150

#### Avaliação Atividade Antimicrobiana

<i>Microc. luteus</i>	sensível	sensível	Sensível
<i>Staph. aureus</i>	sensível	sensível	sensível

- 10 Com a metodologia analítica desenvolvida obtiveram-se cromatogramas com ótima resolução dos componentes do extrato, permitindo a quantificação dos marcadores para diferentes lotes produzidos, utilizando-se padronização externa, conforme figura 3. Os resultados obtidos para os marcadores nos diferentes lotes analisados permitem observar que estes estão padronizados, pois os
- 15 marcadores químicos estão presentes em todos os lotes produzidos dentro da faixa de concentração esperada.

- Para sustentar as atividades biológicas propostas para o extrato padronizado de própolis - EPP-AF, um dos objetos da presente invenção, apresentamos os dados para algumas das atividades propostas, sendo que todos os
- 20 dados apresentados foram obtidos utilizando-se o extrato padronizado objeto da presente invenção.

#### EXEMPLO 2: Atividade Antiinflamatória

- Inicialmente apresentamos a dose efetiva para o extrato padronizado de própolis - EPP-AF a 10,0%p/v de resíduo seco, uma das variações do
- 25 processo anteriormente apresentado para a presente invenção, no protocolo de avaliação da atividade antiinflamatória sob o modelo de edema desencadeado por carragenina, dextrana e histamina. A dose efetiva (DE50) via oral encontrada foi de 650mg/kg, inibindo significativamente o processo inflamatório desencadeado pela carragenina, mas não inibindo o produzido pela dextrana. O extrato padronizado de

própolis (EPP-AF) a 10,0% p/v, antagonizou ainda o efeito edematogênico produzido por histamina. Nas úlceras produzidas por estresse (método de Rainsford e Whitehouse, 1977), o produto inibiu de forma significativa a geração dos diversos tipos classificados. A partir dos resultados obtidos, pode-se sugerir que o extrato em questão apresenta efeito antiinflamatório semelhante ao dos antiinflamatórios não-esteroidais.

#### EXEMPLO 3: Estudo da Toxicidade Subcrônica

Estudou-se na dose efetiva (DE50 = 650,0 mg/kg), os parâmetros hematológicos (eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, VCM, HCM, CHCM, neutrófilo, eosinófilo, linfócito, plaquetas), bioquímicos (glicose, TGO, TGP, uréia, creatinina) e histopatológicos (mucosa, parede gástrica, tecido esofágico, intestino grosso, pulmonar, baço e tecido cardíaco) do extrato padronizado de própolis - EPP-AF a 10,0% p/v, uma das variações da presente invenção, frente ao grupo controle, para estudo da toxicidade em fase de tratamento subcrônico (30 dias) em ratos (n=10). Observou-se que não houve diferença significativa em relação ao grupo controle, sugerindo que na dose de 650 mg/kg (dose eficaz) não existe a presença de efeitos tóxicos que possam comprometer a utilização deste extrato.

#### EXEMPLO 4: Estudo da Atividade Antioxidante

Estudou-se o extrato padronizado de própolis - EPP-AF a 80% m/m de resíduo seco na faixa de 1 µL/mL a 50 µL/mL, frente a frações obtidas da própolis 'in natura' com outros solventes, como clorofórmio, n-butanol e hexano, com o objetivo de investigar o efeito destes produtos no metabolismo oxidativo de neutrófilos de coelho, estimado pela produção de radicais de oxigênio. Este processo foi induzido por partículas opsonizadas com componentes do sistema complemento (C3b, C3bi, C4b, etc.) e a produção de radicais de oxigênio foi medida pela quimioluminescência dependente de luminol e de lucigenina. Os resultados demonstraram que o extrato padronizado de própolis foi o que apresentou o melhor resultado antioxidante nos modelos estudados, quando comparados às demais frações.

#### EXEMPLO 5: Estudo da Atividade Antimicrobiana

Avaliou-se a atividade antimicrobiana do extrato padronizado de própolis - EPP-AF a 10,0 mg/mL frente a *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus*, através da técnica de halo de inibição em placas de ágar, onde obtivemos excelentes resultados para o produto objeto da presente invenção.

#### EXEMPLO 6: Utilização do extrato padronizado de própolis - EPP-AF em formulações para os mais diversos usos

Desenvolveram-se formulações para os mais diversos usos, a base de PEG400 e PEG4000, a base de ceras auto-emulsionantes, dentre outros, com objetivo de uso em cicatrização de feridas, queimaduras, herpes, etc. Assim, esta invenção é uma variação da proposta da invenção do extrato padronizado de própolis -

EPP-AF. Os produtos mantiveram os teores dos marcadores propostos durante todo o período de estabilidade estudado ( $40^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$  /  $75\% \text{ UR} \pm 5\%$ , durante 6 meses – com análises nos tempos 0, 1, 2, 3 e 6 meses). Apresentamos assim, propostas de formulações para os mais diversos usos, em função da comprovação posterior da atividade e indicação terapêutica proposta, conforme o caso.

EXEMPLO 7: Utilização de produtos formulados contendo o extrato padronizado de própolis - EPP-AF em cicatrização de feridas e queimaduras

Os produtos apresentados no exemplo 6 foram estudados, quanto à capacidade de cicatrização de feridas e queimaduras, em modelo experimental animal (ratos Wistar) frente aos controles. Foram estudados dois protocolos experimentais, sendo um com aplicação única do produto e outro com reaplicações de 12 em 12 horas. Os animais foram sacrificados com 3 dias de experimento para avaliação histológica das lesões, que foram efetuadas com auxílio de um punch. Um dos controles (sem aplicação de nenhum produto) foi acompanhado e seu sacrifício ocorreu quando da cicatrização aparente da lesão, que se deu com 7 dias de experimento. Os resultados encontrados mostraram que os produtos se mostraram eficazes na formação do tecido de reepitelização, sendo que se observou um tecido muito bem organizado e fechando em torno de 80% da lesão. Observamos que houve uma intensa proliferação de fibroblastos nas áreas lesadas, sugerindo que o processo cicatricial com a utilização deste produto se dá via estas células.

EXEMPLO 8: Análise da Mutagenicidade dos produtos formulados apresentados no exemplo 6

Os produtos apresentados no exemplo 6 foram estudados, quanto ao potencial mutagênico, em modelo de micronúcleos de células do sangue periférico de ratos wistar. Foram avaliados três protocolos, sendo em um deles aplicação única dos produtos, em outro sete dias de aplicação diária do produto e por último a aplicação diária do produto por 30 dias de estudo. As aplicações do produto foram feitas em região lesada com um punch, com dimensões conhecidas. Aplicaram-se os produtos, um controle negativo e um controle positivo empregando-se agente genotóxico (clastrogênico). Após a coleta do sangue dentro do período estipulado em cada experimento, foi efetuada contagem dos micronúcleos em 2.000 células (n=3). Os resultados encontrados mostraram que os produtos a base de extrato padronizado de própolis - EPP-AF não apresentaram atividade mutagênica. Assim, podemos afirmar que os produtos estudados e o extrato padronizado de própolis (EPP-AF) não apresentam potencial mutagênico.

EXEMPLO 9: Avaliação da atividade Leishmanicida do Extrato padronizado de Própolis – EPP-AF

20

Avaliou-se a atividade leishmanicida do extrato padronizado de própolis - EPP-AF sobre as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (Viannia) brasiliensis*, por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo* por meio do tratamento em animais *Mus musculus* experimentalmente infectados pelo parasita. Pelas observações decorrentes dos ensaios *in vitro*, o extrato padronizado de própolis - EPP-AF apresentou sobre as formas promastigotas porcentagem de lise e valor de coeficiente de inibição (IC50) melhores, quando comparados com o controle positivo (anfotericina B). Não foi observado, no entanto, resultado satisfatório sobre as formas amastigotas. Nos ensaios *in vivo*, durante os 90 dias de tratamento com os compostos em análise, foi verificada a variação do diâmetro médio das lesões dos camundongos *Mus musculus* infectados com *Leishmania (Viannia) brasiliensis*, observando uma diminuição no tamanho das lesões. O extrato padronizado de própolis - EPP-AF apresentou resultado favorável em relação ao controle negativo (solução de cloreto de sódio a 0,9%). Sabendo-se da importância da produção do óxido nítrico (NO) para o controle da infecção sobre diversos parasitas intracelulares, foi avaliada a capacidade de indução de NO, observando-se uma indução significativa para este extrato, objeto da presente invenção.

21

EXEMPLO 10: Alimentos com o extrato padronizado própolis - EPP-AF

Utilizamos o extrato padronizado de própolis - EPP-AF, objeto da presente invenção, em uma variação a 11%p/v em produtos a base de mel com própolis. O produto apresenta como vantagem a padronização da matéria-prima ativa que dará origem a produtos reprodutíveis e confiáveis.

EXEMPLO 11: Produtos de higiene pessoal

Desenvolvemos formulações contendo o extrato padronizado de própolis - EPP-AF a 11% p/v para aplicação oral, uma vez que já foi demonstrada ação antiinflamatória e antibacteriana, justificando o uso do produto em casos de ferimentos e inflamações da cavidade oral. Assim, a fórmula a base de mel, extrato padronizado de própolis 11%p/v, óleo essencial de menta, solução hidroalcoólica e água purificada, apresentou excelente atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus*, justificando sua utilização em procedimentos de assepsia da cavidade oral.

## Reivindicações

1. Processo de obtenção de extrato padronizado de própolis, **caracterizado por** compreender as etapas de:

- (a) coleta da própolis "in natura" proveniente de apicultores, separação desta matéria-prima em lotes padronizados em função dos marcadores químicos identificados e quantificados no controle de qualidade, sendo a identificação e quantificação feita por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) através de método específico;
- (b) homogeneização das matérias-primas avaliadas em (a), em misturador de sólidos, em proporções variáveis de acordo com os teores encontrados dos marcadores na própolis "in natura", de modo a obter uma matéria-prima padronizada de própolis que apresente, quando avaliada, de 44,00 a 52,00 mg/g de flavonóides totais expressos em quercetina e que o extrato obtido desta matéria-prima em soxhlet (11% p/v de resíduo seco) apresente os seguintes limites de qualidade: ácido p-cumárico (6,00 a 8,00 mg/g); artepelin C (80,00 a 100,00 mg/g) e baccharina (30,00 a 40,00 mg/g);
- (c) congelamento da mistura homogênea "in natura" a uma temperatura de  $-25^{\circ}\text{C}$  a  $-5^{\circ}\text{C}$ , seguida de pulverização em moinho de martelo;
- (d) adição da mistura pulverizada ao tanque de aço inox com agitador contendo solução hidroalcoólica na faixa de 50 a 95% v/v, na proporção de 1:2 a 1:5, seguida de agitação contínua por 8 - 12 horas e, subsequente repouso por 24 horas, durante três a 10 dias;
- (e) filtração do extrato assim obtido e transferência deste para um tanque homogeneizador;
- (f) resfriamento do extrato homogeneizado a  $-10^{\circ}\text{C}$  a  $+10^{\circ}\text{C}$  para eliminação da cera;
- (g) submissão do extrato às análises físico-químicas e microbiológicas de qualidade para o extrato assim obtido;
- (h) produção de extrato mole através da concentração do extrato padronizado obtido, em concentrador de aço inox, à temperatura controlada do produto em torno de  $40,0^{\circ}\text{C}$  a  $70^{\circ}\text{C}$  e vácuo de 400,0 a 700 mmHg, até que o extrato apresente teor de 80% de resíduo seco;

(i) análise do extrato padronizado contendo ácido *p*-cumárico, artepelin C (Ácido 3,5-diprenil-*p*-cumárico), bachelarina (Ácido 3-prenil-4-diidrocinaoiloxi-cinâmico) e posterior armazenagem.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** a identificação e quantificação ocorrer por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), que compreende a diluição de 100 µL do extrato padronizado de própolis, no caso de produto acabado, ou do extrato de própolis obtido da matéria-prima em aparelho de soxhlet e padronizado a 11% p/v de resíduo seco (no caso da análise da matéria-prima), previamente centrifugado a 13000 rpm, durante 5 minutos e filtrado em filtro de 45 mm, em metanol, sendo que a fase móvel utilizada compreende gradiente multilinear, onde é possível separar e quantificar os marcadores pesquisados nas matérias-primas e produtos acabados, sendo o ácido cinâmico, que apresenta tempo de retenção em 5,9 min.; aromadendrina 4'-metil-éter, com tempo de retenção em 20,7 min.; drupanin, com tempo de retenção em 26,2 min.; isosakuranetina, com tempo de retenção em 35,6 min.; artepelin C, com tempo de retenção em 55,2 minutos, e finalmente, a bachelarina, com tempo de retenção em 58,3 minutos.

3. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** a temperatura de congelamento da mistura homogênea "in natura" ser de -10°C a -5°C.

4. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** ser utilizado como veículo de extração uma solução hidroalcoólica de 60 a 80% v/v, na proporção de 1:2 a 1:3, seguida de agitação contínua por 12 horas e subsequente repouso por 24 horas durante 3 dias.

5. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** a produção de extrato mole ser obtida através da concentração do extrato padronizado, em concentrador de aço inox, à temperatura controlada do produto em torno de 50,0 °C a 60°C e pressão de vácuo de aproximadamente 500,0 mmHg.

6. Formulações **caracterizadas por** conter o extrato padronizado de própolis, PEG 400 e PEG 4000, cera auto-emulsionante, e outros, conforme processo das reivindicações 1 a 5, em proporções podendo variar de 1 a 50%.

7. Produto para higiene pessoal **caracterizado por** conter extrato padronizado de própolis, objeto das reivindicações 1 a 5, mel, óleo essencial de menta e/ou outros óleos e aromas, e/ou extratos vegetais e água purificada, em qualquer forma de apresentação.

8. Produto alimentício **caracterizado por** conter o extrato padronizado de própolis obtido conforme processo das reivindicações 1 a 5, associado a alimentos como o mel, cereais, etc.

26

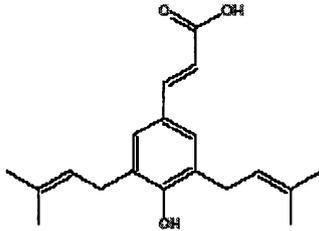
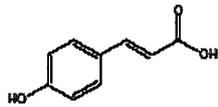
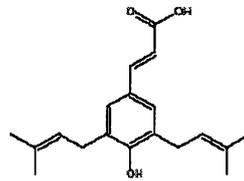


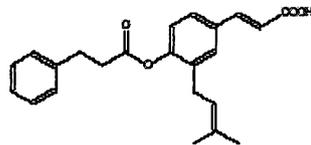
Figura 1



Acido p-cumárico

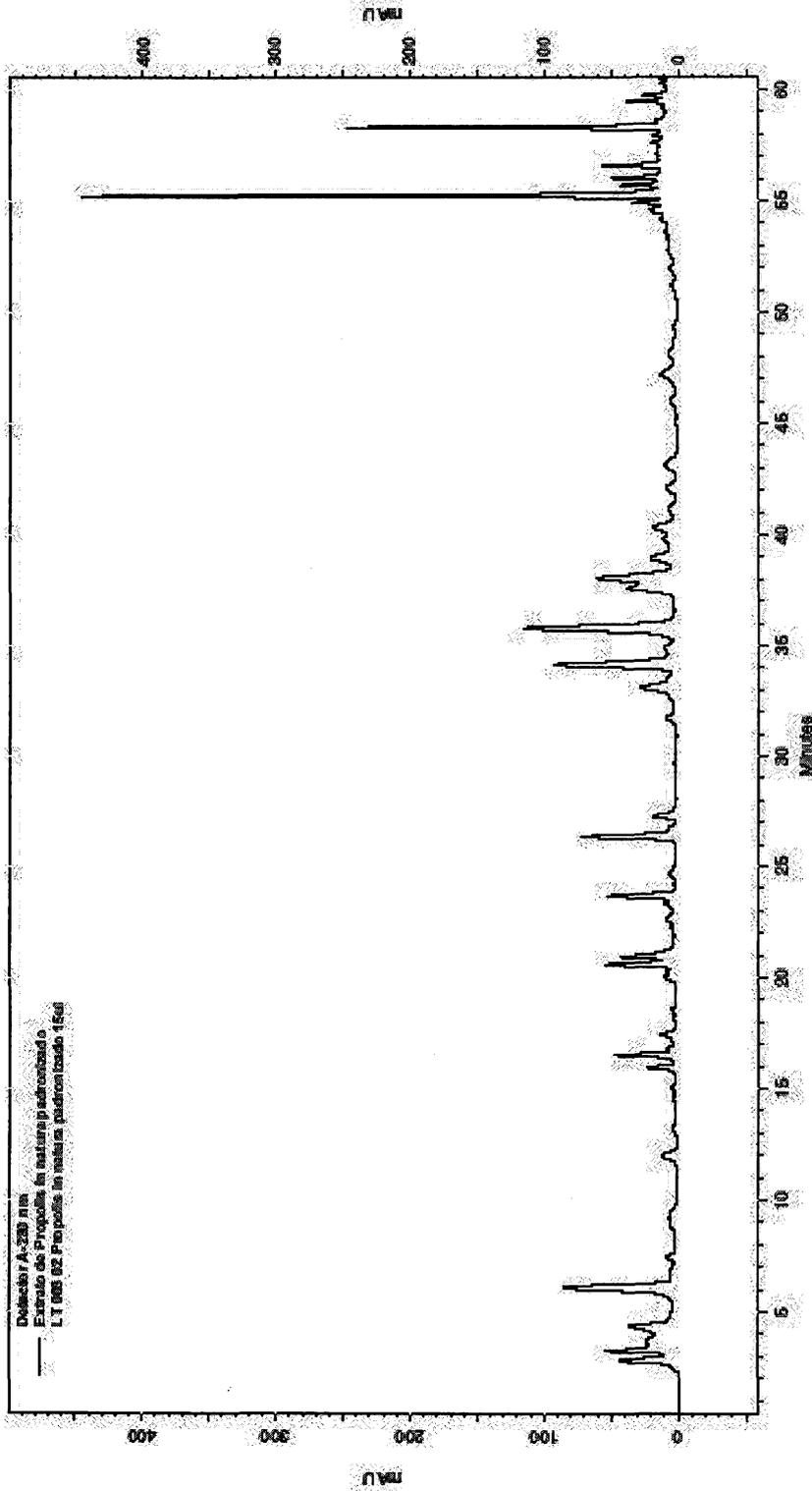


Artepin C



Baccharina

Figura 2



27

Figura 3

## Resumo

**Processo de obtenção de extrato padronizado de própolis, extrato assim obtido, suas formulações, produtos e usos.** Refere-se a presente invenção a um processo de obtenção de extrato padronizado de própolis, ao extrato padronizado propriamente dito, suas formulações, produtos e suas utilizações terapêuticas, sendo que o processo utiliza como matéria-prima, a própolis "in natura" proveniente de regiões específicas de acordo com a bioatividade e análise química de cada uma, em critério de proporcionalidade em função do teor dos marcadores encontrados na matéria-prima, que assegura uma composição química e atividade biológica dentro dos limites de aceitabilidade especificados e estável em todos os lotes pesquisados, garantindo a eficácia terapêutica das mesmas. O extrato padronizado é usado no combate às doenças que se caracterizam por infecções microbianas, virais, fúngicas, parasitárias, tumorais, queimaduras e feridas, etc., em função das atividades biológicas: atividade antimicrobiana frente a microrganismos *gram* negativos, *gram* positivos, antifúngica, antioxidante, antimutagênica, antiinflamatória, antiparasitária, cicatrizante e regeneradora de tecidos, podendo ser empregado como matéria-prima para a indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia.

28